



Title	Streptococcus gordoniiによるPorphyromonas gingivalis線毛と唾液酸性高プロリントタンパク質の結合を阻害するペプチドの分泌
Author(s)	片岡, 宏介
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169598
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文題名

Streptococcus gordonii による *Porphyromonas gingivalis* 線毛と唾液酸性高プロリントタンパク質の結合を阻害するペプチドの分泌

学位申請者

片 岡 宏 介

*Streptococcus gordonii*による*Porphyromonas gingivalis*線毛と唾液酸性高プロリントタンパク質の結合を阻害するペプチドの分泌

片 岡 宏 介

結 言

有力な歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis*^{1,3)}は、口腔粘膜⁴⁾、歯肉溝⁵⁾や歯肉縁上・縁下プラーク⁶⁾といった様々な部位から検出されており、これら表面への付着には本菌体表層に存在する付着性構造物である線毛が主要な役割を果たすと考えられている⁷⁾。*P. gingivalis* 菌体は、その線毛を介して、唾液被覆ハイドロキシアパタイトビーズ (HA と略す) 表面に付着すること⁸⁾や、また、口腔常在グラム陽性菌菌体とも結合すること⁹⁾が報告されている。そして、*P. gingivalis* 線毛欠損株では、HA やグラム陽性菌への結合性が低下するとの知見^{9,10)}が報告されている。*P. gingivalis* の口腔への定着過程において、*P. gingivalis* 線毛は、様々な表層物質と相互作用をすると考えられる。しかし、口腔内の歯、軟組織や細菌の表面の多くは唾液によって浸漬され特定の唾液成分に被覆されており^{11,12)}、*P. gingivalis* 線毛と唾液ペリクル中の特定の唾液タンパク質との強固な結合¹³⁻¹⁵⁾は、本菌の口腔への初期定着の重要なステップのひとつである¹⁴⁻²⁰⁾と考えられる。*P. gingivalis* 線毛と唾液タンパク質の相互作用として、Amano ら¹¹⁾は線毛が酸性高プロリントタンパク質 (PRPs と略す) やスタセリンに対して特異的に結合することを示した。そして、これらの結合は、アミノ酸、糖、シアル酸などでは抑制されず、*P. gingivalis* 線毛のサブユニットであるリコンビナントフィンブリリンで抑制されたことより、*P. gingivalis* 線毛と PRPs やスタセリンとの結合は、タンパク質-タンパク質相互作用によっておこる特異的な結合と考えられている^{8,15)}。

唾液タンパク質中の高プロリントタンパク質は、PRPs、高プロリン糖タンパク質 (PRGP) および塩基性高プロリントタンパク質を含め、唾液タンパク質成分の 40-60 % を占めており²¹⁾、PRPs は 6 つのア

イソフォーム (PRP1, PIF-s, PRP2, PRP3, PIF-f, PRP-4) を有している。その主要アイソフォームでもある PRP1 と PRP2 は、それぞれ 150 アミノ酸残基からなり、これらは、他のアイソフォームよりも *P. gingivalis* と強く結合することが知られている²²⁾。Gibbons らは、PRP1 は溶液中では菌体と結合しないが、HA 表面に吸着すると立体構造変化が生じ、細菌に対する潜在レセプター (cryptic receptor または cryptitopes) が露出し、菌体と結合するようになると報告している^{19,20,22)}。さらに、Gibbons らは、PRP1 のカルボキシル基 (C) 末端側 44 アミノ酸残基の欠落した PRP3 と *P. gingivalis* 菌体とは、わずかな結合しか認められなかったと報告し、このことより、PRP1 が HA に結合するには PRP1 の C 末端側 44 残基を必要とし、その部分が *P. gingivalis* 菌体との結合レセプターになるという仮説をたてている²⁰⁾。しかし、現在のところ、*P. gingivalis* 線毛と結合する PRP1 の結合領域について、その詳細は明らかにされていない。

近年、分子生物学的手法を用いて、口腔常在レンサ球菌の遺伝子組み換えを行うことにより、生物学的活性をもつ種々のタンパク質を発現・分泌させ、これら技術を応用して、宿主防御免疫反応を強化し、病原性細菌の定着を抑制するといった研究が進められている²³⁻²⁶⁾。*P. gingivalis* 線毛と結合する PRP1 分子内での最小結合領域を明らかにし、その結合領域を含むペプチドを口腔レンサ球菌に発現・分泌させることができれば、有用な *P. gingivalis* の口腔への定着抑制モデルを提供するものと思われる。

本研究では、*P. gingivalis* 線毛と結合する PRP1 分子中の結合領域の検索を行い、さらに、この結合領域ペプチドを口腔常在菌である *Streptococcus gordonii* 形質転換株に分泌させ、このリコンビナントペプチドが *P. gingivalis* の線毛を介する結合

に及ぼす影響について調べることを目的として、以下の実験を行った。

材料ならびに方法

1. 供試菌株

P. gingivalis ATCC 33277 株は、サンスター株式会社研究開発部より分与され、CDC 嫌気性菌用羊血液寒天培地 (BBL: Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD., U.S.A.) に接種し、嫌気培養装置 (Forma Scientific Anaerobic System Model 1024, Marietta, OH., U.S.A.) を用い、嫌气的条件下 ($10\% \text{CO}_2$, $10\% \text{H}_2$, $80\% \text{N}_2$) にて 35°C で培養を行い、1 週間ごとに、新たな培地に継代培養して保存した。供試菌の培養は、保存培地より 1 mg/ml の酵母エキスを、 $5 \mu\text{g/ml}$ のヘミンおよび $1 \mu\text{g/ml}$ のメナジオンを含むトリプチケースソイブロス (BBL) 10 ml に接種し、嫌气的条件下にて 35°C で培養した。この培養液を同培養液 90 ml に移し、同一条件下で静止期初期 (約 18 時間) まで培養した。培養した *P. gingivalis* を、Lee らの方法¹¹⁾によりトリチウム標識し、さらに、 $1 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgCl_2 を含む KCl 緩衝液 ($\text{pH } 6.8$) で洗浄し、結合実験に供試した。*S. gordonii* G9B 株、*Streptococcus mitis* ATCC 15909 株、ATCC 15912 株、*Streptococcus oralis* ATCC 9811 株、ATCC 10557 株、*Streptococcus sanguis* ATCC 10556 株および *Streptococcus downei* MFe28 株は、当研究室で継代培養し、凍結保存した菌株を用いた。これら供試株は、ブレインハートインフュージョン (BHI) アガー (Difco Laboratories, Detroit, MI., U.S.A.) の高層培地に穿刺培養した後 4°C で冷所保存し、1 カ月ごとに穿刺継代培養したものを用いた。供試菌の培養は、保存培地より BHI ブロス (Difco Laboratories) 10 ml に接種し、大気中にて 37°C で培養した。この培養液を同培養液 90 ml に移し、同一条件下で静止期初期 (約 12 時間) まで静置培養した。これら菌体は、 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (PBS, $\text{pH } 7.2$) により洗浄後、 10 mM PBS ($\text{pH } 7.2$) により菌懸濁液を調製し、共凝集阻害実験に供した²⁷⁾。*Escherichia coli* JM109 株は、Luria-Bertani (GIBCO BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) 液体培地および寒天培地にて培養を行っ

た。なお、*E. coli* の培養には、 $50 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン (和光純薬工業株式会社、大阪)、*S. gordonii* の培養には、 $50 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン、 $20 \mu\text{g/ml}$ エリスロマイシン (和光純薬) を添加したものを選択培地として用いた。

2. *P. gingivalis* 線毛の調製

線毛は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株から Yoshimura らの方法³¹⁾により精製し、それを Lee らの方法¹¹⁾によってヨード標識した。

3. PRP1 の精製と 3 種の PRP1 フラグメントの調製

PRP1 は、3 人の男性被験者からヒト顎舌下腺唾液を採取し、Ramasubbu らの方法²⁹⁾を用いて精製した。精製した 1 mg の PRP1 は、 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 4 M 尿素溶液で、 4°C 、一晚透析し、さらに、 10 mM トリス塩酸塩緩衝液 (Tris-HCl, $\text{pH } 9.5$) にて透析を行った。これら透析後のサンプルは、リジルエンドペプチダーゼ (*Achromobacter protease I*, 和光純薬) を酵素/基質 = $1/200$ (モル比) の割合で加え、 30°C 、6 時間反応させ、PRP1 の 2 カ所のリジル残基の C 末端側で切断し、3 つのフラグメントに分解した。これら 3 つのフラグメントのうち、N 末端断片を N フラグメント、中央断片を M フラグメント、そして、C 末端断片を pPRP-C フラグメントと呼ぶ。3 つのフラグメントは、Waters C4 逆相カラム ($0.39 \times 15 \text{ cm}$, 300 \AA , Millipore Co., Milford, MA., U.S.A.) による L6210 型高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) システム (日立製作所、東京) を用いて、 0.1% トリフルオロ酢酸溶液 (TFA; 和光純薬) と TFA を含むイソプロパノール-アセトニトリル ($7/3$ 容量比) 溶液による直線の濃度勾配法により分離精製した³⁰⁾。精製した各フラグメントについて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により均一性を確認後、アミノ酸配列と分析をそれぞれ 477A/120 気相式オートマチックシーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA., U.S.A.) と日立 835S アミノ酸分析装置 (日立製作所) を用いて行った³⁰⁾。

4. ドットプロット法

ドットプロット法は、Amano らの方法¹⁴⁾によった。PRP1 およびリジルエンドペプチダーゼにより消化

分解した各フラグメントを Bio-Dot 装置を用いて、ポリビニリジンジフルオライド転写膜 (polyvinylidene difluoride: PVDF, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA., U.S.A.) に吸引吸着させた。その PVDF 膜を 2% lipid-free 牛血清アルブミン (BSA, A-7030 Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.) によりブロッキングし、20 pmol/ml のヨード標識した *P. gingivalis* 線毛 (^{125}I -Fim) 3 ml と 3 時間室温でインキュベートし、さらに、100 mM 塩化ナトリウムを含む KCl 緩衝液 (pH 6.8) により洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

5. PRP1 ペプチドフラグメントによる *P. gingivalis* 線毛または菌体の PRP1 被覆 HA への結合阻害実験

PRP1 ペプチドフラグメントによる ^{125}I -Fim とトリチウム標識した *P. gingivalis* 菌体 (^3H -cell) の PRP1 被覆 HA への結合阻害実験は Amano らの方法^{11,14,15)}により行った。阻害実験には、N, M と pPRP-C の各フラグメント、そして、種々の合成ペプチド (北海道システムサイエンス株式会社、北海道) および精製 PRP1 を用いた。まず、KCl 緩衝液 (pH 6.8) に溶解した 1 $\mu\text{mol/ml}$ の各ペプチド溶液と 5 nmol/ml の ^{125}I -Fim または $5 \times 10^6/\text{ml}$ の ^3H -cell とをプレインキュベートした。さらに、この溶液と PRP1 被覆 HA とを室温で 1 時間インキュベートし、放射活性を測定し、結合量を算出した。あらかじめ 50 倍量の非標識の線毛 (50 nmol/ml, 500 μl) を PRP1 被覆 HA に添加後、5 nmol/ml の ^{125}I -Fim または、 $5 \times 10^6/\text{ml}$ の ^3H -cell を加えることにより求められた結合量を非特異的結合量とし、総結合量から非特異的結合量を差し引いた値を特異的結合量とした。

6. PRP1 合成ペプチドと線毛との結合実験

合成ペプチドと線毛との結合実験を 96 穴マイクロタイタープレート (平底アミノプレートタイプ A, 住友ベークライト株式会社、東京) を用い、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) により行なった¹⁴⁾。各ウェルを 2% グルタルアルデヒドを含む PBS (pH 7.2) 100 μl を分注し、固相面を活性化させた後、PBS に溶解した 2 $\mu\text{mol/ml}$ の PRP1 および 2 $\mu\text{mol/ml}$ の 5 種の合成ペプチドを、一晩 4 $^{\circ}\text{C}$ で固相化した。各ウェルを、0.1% Tween20 を含む PBS (PBST: pH 7.2) により

3 回洗浄し、2% Block Ace (牛乳から抽出されたカゼイン溶液; 雪印乳業株式会社、北海道) により室温、1 時間のブロッキングを行った。PBST による 3 回の洗浄後、各ウェルに 5 nmol/ml の線毛を加え、室温で 3 時間インキュベートした。PBST による洗浄後、5000 倍希釈したウサギ抗線毛抗体³¹⁾ 100 μl を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩インキュベートした。そして、1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed Laboratories, Inc., CA., U.S.A.) と室温、3 時間反応させた後、*p*-リン酸ニトロフェニル (Sigma) を基質としたジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) により発色させ、405 nm での吸光度を測定した。非特異的結合量は、2 mM の lipid-free BSA を陰性対照として用いることにより求めた。

7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Phast system (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) を用い、通法に従って行った。ペプチドフラグメント標品を 2.5% SDS, 1 mM エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム (EDTA), 0.01% ブロムフェノールブルーおよび 5% β -メルカプトエタノールを含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 30 μl に溶解した後、100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間熱処理した。0.0112 M 酢酸および 0.11 M トリスアミノメタンを含む PhastGel High Density (Pharmacia LKB) を支持体として、緩衝液は 0.20 M トリシン, 0.20 M トリスおよび 0.55% SDS を含む PhastGel SDS Buffer Strips (Pharmacia LKB) を用い、15 $^{\circ}\text{C}$ 、10 mA の条件下で泳動した。泳動後、タンパク質をクマシー・ブリリアントブルー R350 を用いて染色した。分子量測定用標準タンパク質マーカー (分子量測定キット; Pharmacia LKB) として、BSA, 卵白アルブミン, 炭酸脱水酵素, 大豆トリプシンインヒビター, α -ラクトアルブミン, グロビン, グロビン I+II, グロビン I, グロビン II および グロビン III を用いた。

8. pPRP-C に対するウサギポリクローナル抗体の作製

pPRP-C は、低分子量 (MW 2119) のため、MBS (*m*-マレイミドベンゾイロキシサクシニル) 法³²⁾により重合し抗原として使用した。同重合抗原を完全

アジュバンド (Difco) と混和し、氷冷中で超音波処理を行って油中水型乳剤を作製し、2週間ごとに計5回 (0.67 mg/0.3 ml PBS, pH 7.5) ウサギ皮下に注射し免疫を行った。全採血を行い得られた血清をPBS (pH 7.2) で透析し、Protein A アフィニティカラム (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden) を用いて精製し、ウサギ抗 pPRP-C IgG 標品を得た。

9. ペプチド・タンパク質の定量

定量は、色素結合法に基づいた Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) を用いた。標準タンパク質として、BSA (Sigma) を用いた。

10. pMNK-5 プラスミドの構築

1) DNA フラグメントのアガロース電気泳動と抽出

アガロース (Agarose S: 和光純薬) を2% になるようにトリス酢酸緩衝液 (TAE: pH 8.0) に加熱溶解したものを泳動用ゲルとして用いた。泳動用緩衝液に TAE 緩衝液を用い、100 V で泳動を行った。泳動後、ゲルを臭化エチジウム (1 µg/ml, 和光純薬) 溶液で 10-30 分染色後、波長 312 nm の紫外線で DNA の存在を確認した。DNA フラグメントの抽出は、QIAEXII gel extraction kit (フナコシ株式会社, 東京) を用いた。

2) pMNK-4 プラスミドの供与

E. coli と *S. gordonii* のシャトルベクタープラスミド pMNK-4 は、森田 隆博士 (大阪大学微生物学研究所) より供与された。なお、pMNK-4 プラスミドは、pVA838³³⁾由来であり、*Anthrobacter* CB-8 株由来のデキストラナーゼを発現、分泌するように構築されたものである。シグナルペプチドとして、*S. downei* MFe28 株のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子相当の塩基配列をもち、ターミネーターに、*E. coli* 由来の *rrnB112* を置換挿入している²³⁾。

3) pMNK-5 の構築 (pPRP-C 遺伝子配列の置換)

pMNK-4 のプロモーターとシグナルペプチドシーケンスを含む DNA フラグメントを得るために以下のオリゴヌクレオチドを設計し、pMNK-4 を鋳型に polymerase chain reaction (PCR) 法を行った。

5'-GCGCATGCGGATCGTCTATGGTAAAACAGAGAAGAA-3'

5'-TGCGCTAGCAACTGAAGCACCGAGA-3'

下線部は、*Sph* I と *Nhe* I の制限酵素切断部位である。PCR 産物は、pGEM-T プラスミド (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.) に挿入し、373DNA シーケンシングシステム (Perkin Elmer Co., Foster City, CA, U.S.A.) により増幅産物の遺伝子配列を確認した。*Sph* I と *Nhe* I により切断後、アガロース電気泳動し、[promotor-signal sequence] フラグメントを抽出した。

pPRP-C をコードする DNA フラグメント [prp-c] は、以下のオリゴヌクレオチドを合成し自己相補鎖結合させ、ハイドロキシアパタイトカラム (CHT2-I, Bio-Rad Laboratories) を用いた FPLC バイオロジックワークステーション (Bio-Rad Laboratories) により精製した。

5'-CTAGCGCACCCCAGGGACCACTCCCCAAGGGGGCCGCCCAAGGACCTCCACAGGGGCGAGTCTCCTCAGTGAAAG-3'

5'-TCGACTTTCCTGAGGAGACTGCCCTGTGGAGGTCCTTGTGGCGGCCCCCTTGGGGAGGTGGTCCCTGGGGTGCG-3'

精製した [prp-c] フラグメントは、*Sal* I と *Nhe* I の制限酵素切断部位をもつ以下のプライマーにより [prp-c] を鋳型に PCR 増幅し、増幅産物は、*Sal* I と *Nhe* I により切断した。

5'-GCTAGCGCACCCCAGGGACCACTCCC-3'

5'-GTCGACTTTCCTGAGGAGACTGCCCC-3'

[promotor-signal sequence] フラグメントと [prp-c] フラグメントを DNA ligation kit (Ver.2 宝酒造株式会社, 京都) を用いて結合し [promotor-signal sequence-prp-c] フラグメントとした。次いで [promotor-signal sequence-prp-c] フラグメントを pUC19 プラスミド (宝酒造株式会社) に挿入し、*E. coli* JM109 株でサブクローニングを行った。pMNK-4 をあらかじめ制限酵素 *Sph* I と *Sal* I で消化後、[promotor-signal sequence-prp-c] フラグメントを挿入接合し pMNK-5 プラスミドを構築した。

11. *S. gordonii* への形質転換

S. gordonii G9B 株は、0.2% 酵母エキス、20 mM グリシンを含む Todd-Hewitt (THYG) ブロスに接種し、37 °Cで一晩培養した。菌液 1 に対して THYG ブロス 20 の割合で培養し、培養液の濁度が波長 600 nm で 0.20 になるまで培養した。遠心処理により菌体を回収し、43 °C処理を行った。200 µl の 15% グリセロール溶液にこのコンピテント細胞を

溶解し、1 μ g の pMNK-5 プラスミドを加え、エレクトロポレーション法 (1.75 kV, 25 μ F, 400 Ω , 7 msec) により形質転換した。60 分氷冷後、THY ブロスに接種し 1 時間 37 $^{\circ}$ C 培養後、20 mM グルコース、25 μ g/ml エリスロマイシンを含む BHI アガーに接種し、得られた抗生物質耐性コロニーを形質転換株 (recombinant *S. gordonii*) とした。以下、形質転換株を r-Sg、野生株を w-Sg と略す。

12. r-Sg における recombinant pPRP-C (r-pPRP-C) 分泌の確認と定量

r-Sg は、25 μ g/ml エリスロマイシンを含む THY ブロスに接種し、37 $^{\circ}$ C で培養した。その培養上清は、4 $^{\circ}$ C、一晚、脱イオン水に対して透析 (カットオフ分子量 500, Spectrum Medical Industry Inc., Gardena, CA., U.S.A.) を行い、その後、限外濾過 (カットオフ分子量 2000, 東洋濾紙株式会社、東京) を行った。この透析、限外濾過後の上清を凍結乾燥した濃縮粉末 (以後、r-Sg 粗標品と記す) を、KCl 緩衝液 (pH 6.8) により体積比で 47 倍濃縮相当の 40 mg/ml の粗標品溶液となるように調整した。以後、これを r-Sg 粗標品溶液と記す。また、wild 株培養上清からの調製も上記と同様に行い、以後、w-Sg 粗標品溶液と記す。

次に、標品として 1 mg/ml の合成 pPRP-C、r-Sg 粗標品溶液、または w-Sg 粗標品溶液を用い、PVDF 転写膜に吸引転写した。この PVDF 膜を 1% BSA を含む TBST (0.14 M NaCl と 0.05% Tween 20 を含む 25 mM トリス緩衝液; pH 7.4) 溶液中で室温 15 分放置した。ついで、TBST 溶液で 1000 倍希釈したウサギ抗 pPRP-C IgG と 4 $^{\circ}$ C、一晚、反応させ、TBST で 3 回洗浄後、TBST 溶液で 2000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed Laboratories) と室温で 2 時間反応させた。さらに HRP conjugate substrate kit (Bio-Rad Laboratories) を用い、発色させた。

pPRP-C と r-pPRP-C の検出は、オートラジオグラフィによる ECL ウェスタンブロッティング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。標品として、1 mg/ml の合成 pPRP-C、r-Sg 粗標品溶液、または w-Sg 粗標品溶液を供した。まず、アクリルアミド濃度 15%-25% の勾配ゲル (第一化学薬品株式会社、東京) を用い、SDS-PAGE を、

Laemmli の方法³⁴⁾に準じて行った。分子量測定用マーカーとして低分子量測定用電気泳動キット (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad) を用いた。

次いで、平板型転写装置 (トランスブロット SD システム; Bio-Rad Laboratories) を用いて、25 V, 40 分通電することによりアクリルアミドゲル層から Hybond-ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech) へ、タンパク質を転写した。このニトロセルロース膜を 1% BSA を含む TBST 溶液中で室温 15 分放置した。転写膜は、1000 倍希釈したウサギ抗 pPRP-C IgG と 4 $^{\circ}$ C 一晚の反応後、2000 倍希釈した HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温で 2 時間反応させ、オートラジオグラフィーにより検出した。

培養上清中に分泌された r-pPRP-C の定量は、ELISA 法によった¹⁴⁾。まず、検量線を求めるために w-Sg の培養上清に pPRP-C 濃度が 0, 2, 4, 8, 16 nmol/ml となるように調整した各サンプル 100 μ l または r-Sg 粗標品溶液 100 μ l を、それぞれ 4 $^{\circ}$ C で一晚固相化した。2% Block Ace により室温、1 時間ブロッキングした後、2000 倍希釈したウサギ抗 pPRP-C 抗体 100 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で一晚インキュベートを行った。ついで 1000 倍希釈した HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温で 2 時間反応させた。洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン を基質として発色させ 450 nm での吸光度を測定した。

13. pPRP-C と r-pPRP-C による共凝集阻害実験

1) pPRP-C による共凝集阻害実験

P. gingivalis と口腔レンサ球菌との共凝集に及ぼす pPRP-C の影響を、Nagata ら²⁷⁾の共凝集活性の測定方法を用いることにより調べた。10 mM PBS (pH 7.2) 500 μ l に懸濁した 5×10^8 個の *P. gingivalis* と 5×10^8 個の口腔レンサ球菌 (*S. gordonii* G9B 株, *S. mitis* ATCC 15909 株, ATCC 15912 株, *S. oralis* ATCC 9811 株, ATCC 10557 株, *S. sanguis* ATCC 10556 株, *S. downei* MFe28 株), そして、濃度を変えた pPRP-C 溶液 1 ml を加え、分光光度計 (UV-265FW: 島津製作所、京都) を用いて、37 $^{\circ}$ C で攪拌しながら、波長 550 nm の吸光度 (A550) の変化を 7.5 分間測定した。ある時点の前後 0.5 分間、すなわち各 1 分間の吸光度の差 (dA/dT) を連続的

にかつ自動的に計算させ、それを記録させた後、1分あたりの最大の吸光度変化量を読み取った。阻害剤を加えた時の阻害率は、以下の式によった。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{ (\text{阻害剤を添加しない時の共凝集活性}) - (\text{阻害剤を添加した時の共凝集活性}) \} / (\text{阻害剤を添加しない時の共凝集活性}) \times 100$$

2) r-Sg 粗標品による共凝集阻害実験

阻害剤としての r-Sg 粗標品溶液は、着色しており、吸光度変化をよみとる Nagata らの方法を用いることは困難なため、*P. gingivalis* 懸濁液に口腔レンサ球菌と阻害剤を加えたものを肉眼的に 5 段階 (0~4+) で判定する Cisar らの方法³⁵⁾を用いた。1 mM Tris-HCl (pH 7.2), それぞれ 200 μ l に懸濁した 5×10^8 個の *P. gingivalis* と 5×10^8 個の各口腔レンサ球菌、そして阻害剤として 200 nmol/ml の pPRP-C 溶液、r-Sg 粗標品溶液、または w-Sg 粗標品溶液を 200 μ l 加え、室温で 10 分間振盪させた後、共凝集を肉眼的に判定した。

14.統計処理

各実験における測定値の統計処理は、平均値と標準誤差を算出し、Student's *t* 検定を用い、危険率 1% で有意差の有無を検定した。

実験結果

1.PRPI フラグメント (N フラグメント, M フラグメント, pPRP-C フラグメント) の *P. gingivalis* 線毛との結合

唾液から精製した PRPI を、リジルエンドペプチダーゼにより消化分解し、C4 逆相カラムによる HPLC で精製し得られた各標品の SDS-PAGE の結果を図 1 に示した。N フラグメント、M フラグメントおよび pPRP-C フラグメントの各ペプチドフラグメントは、推定された分子量に相当する位置に単一のバンドとして認められた。また、アミノ酸分析とアミノ酸配列の結果から、N フラグメントは、PRPI 中の 1-74 アミノ酸残基、M フラグメントは、75-129 アミノ酸残基、そして、pPRP-C フラグメントは、130-150 アミノ酸残基に相当するペプチドであることを確認した。

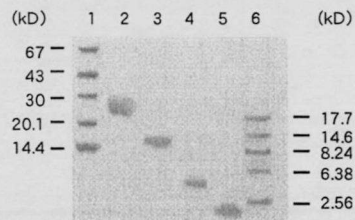


図1 リジルエンドペプチダーゼ処理後のPRPI分解フラグメントの SDS-PAGE 像

1,6. 分子量測定用マーカー 2.PRPI 3.Nフラグメント
4.Mフラグメント 5.pPRP-Cフラグメント

各 PRPI フラグメントと 125 I-Fim との結合をドットブロット法により評価した。図 2 に示すように、線毛は pPRP-C フラグメントと強い結合を示し、PRPI と同程度の結合が認められた。また、M フラグメントに対しても弱い結合が認められたが、N フラグメントには、全く結合がみられなかった。

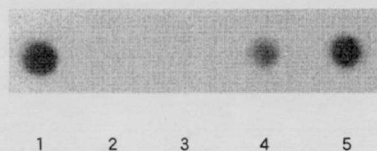


図2 PRPI分解フラグメントの*P. gingivalis*線毛との結合

1.PRPI 2.BSA 3.Nフラグメント 4.Mフラグメント
5.pPRP-Cフラグメント

2.*P. gingivalis* 菌体および線毛の PRPI 被覆 HA への結合に及ぼす PRPI 分解フラグメントの影響

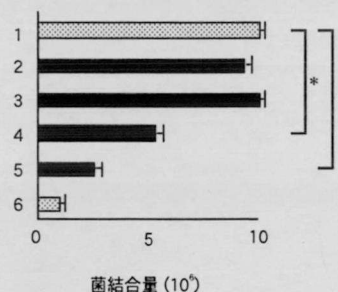


図3 *P. gingivalis*菌体のPRPI被覆HAへの結合に及ぼすPRPI分解フラグメントによる影響

1.インヒビターなし 2.PRPI 3.Nフラグメント
4.Mフラグメント 5.pPRP-Cフラグメント 6.非標識線毛
(*:各値は平均値±標準偏差を示し、 $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

図 3 に示すように菌体の PRPI 被覆 HA への結合に対して、pPRP-C フラグメントは 84%、M フラグメントは 49%の阻害を示し、有意な差が認められ

た。しかし、N フラグメントでは阻害がみられなかった。

図4に示すように線毛のPRP1被覆HAへの結合に対して、pPRP-C フラグメントは、ほぼ100%、M フラグメントは83%の阻害を示し、有意な差が認められた。N フラグメントでは5%の阻害しか認められなかった。これらのことより、PRP1の150アミノ酸残基中の75から150アミノ酸配列中に*P. gingivalis*線毛との結合領域の存在が示唆された。

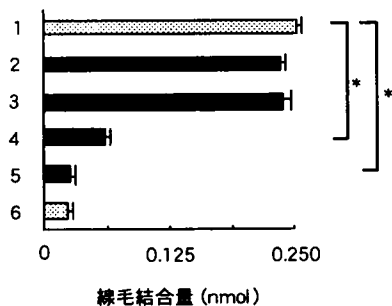


図4 *P. gingivalis*線毛のPRP1被覆HAへの結合に及ぼすPRP1分解フラグメントによる影響

1. インヒビターなし 2. PRP1 3. Nフラグメント
4. Mフラグメント 5. pPRP-Cフラグメント 6. 非線毛線毛
(*: 各値は平均値±標準偏差を示し、 $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

3. PRP1C末端側5分割合成ペプチドにPRP1結合部位の同定

表1 合成ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列
peptide75-89	PQGPPQGGHPPPPQ
peptide90-106	GRPQGPPQGGHPRPPR
peptide107-120	GRPQGPPQGGHQQ
peptide121-129	GPPPPPPGK
pPRP-C	PQGPPQGGRPQGPPQGQSPQ
peptide130-137	PQGPPPPQG
peptide138-145	GRPQGPPQ
peptide146-150	GQSPQ

PRP1の75から150アミノ酸配列中の*P. gingivalis*線毛結合領域をさらに明確にするために、表1に示したアミノ酸残基75-89に相当するペプチド(peptide75-89と記す)、peptide90-106、peptide107-120、peptide121-129、pPRP-Cのペプチドを合成した。その各合成ペプチドと*P. gingivalis*線毛との直接的な結合をELISA法により測定した。

図5に示すように、pPRP-Cは*P. gingivalis*線毛と非常に強い結合を示した。それぞれ、peptide75-89、peptide90-106、peptide107-120は、*P. gingivalis*線毛とPRP1との結合量の77%、78%、86%の結合量が認められた。これら4つのペプチド配列中の共通アミノ酸配列は、PQGPPQであり、同配列は、PRP1中には、75-80、92-97、109-114、140-145番目に存在した。

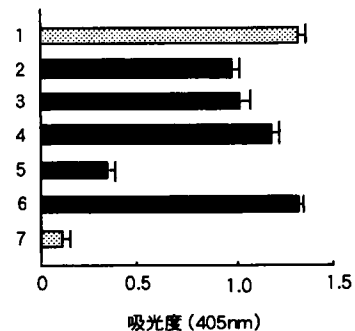


図5 ELISA法による合成ペプチドと*P. gingivalis*線毛との結合性

1. PRP1 2. peptide75-89 3. peptide90-106
4. peptide107-120 5. peptide121-129 6. pPRP-C
7. BSA
(各値は平均値±標準偏差を示す)

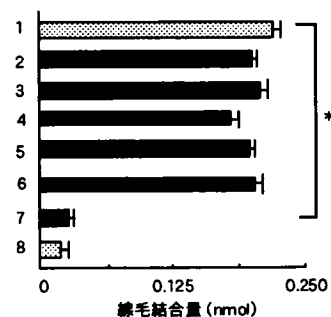


図6 合成ペプチドによる*P. gingivalis*線毛のPRP1被覆HAへの結合の阻害

1. インヒビターなし 2. PRP1 3. peptide75-89
4. peptide90-106 5. peptide107-120 6. peptide121-129
7. pPRP-C 8. 非線毛線毛
(*: 各値は平均値±標準偏差を示し、 $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

次にこれら合成ペプチドを用いた¹²⁵I-FimのPRP1被覆HAへの結合阻害実験を行った。図6に示すように、pPRP-Cのみがほぼ100%に近い結合阻害を示し、有意な差が認められたが、PRP1および他のペプチドではほとんど阻害はみられなかった。

4.pPRP-C 中の線毛結合部位の同定

pPRP-C 中の *P. gingivalis* 線毛との結合部位を検索するために、表 1 に示した 3 つの合成ペプチド (peptide130-137, peptide 138-145, peptide 146-150) を 125 I-Fim の PRP1 被覆 HA への結合阻害実験に供した。

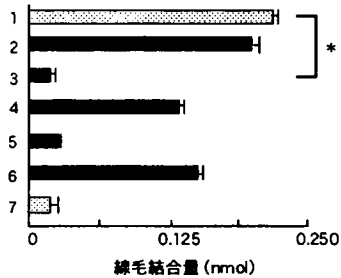


図7 pPRP-C内の合成ペプチドによる*P. gingivalis*線毛のPRP1被覆HAへの結合の阻害

1. インヒビターなし 2. PRP1 3. pPRP-C 4. peptide130-137
5. peptide138-145 6. peptide146-150 7. 非標識線毛
(*: 各値は平均値±標準偏差を示し, $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

図 7 に示すように, peptide138-145 が pPRP-C と同程度の結合阻害を示した. peptide130-137 および peptide146-150 においても弱いながら阻害が認められたが, pPRP-C と同等の強い阻害は認められなかった. このことより, *P. gingivalis* 線毛の PRP1 との結合部位が peptide138-145 に相当する GRPQGPPQ 内に存在することが推測された.

5.PR1 の線毛最小結合部位の同定

表2 GRPQGPPQを基にしたデリーション合成ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列
(peptide 138-145	GRPQGPPQ)
P1	RPQGPPQ
P2	PQGPPQ
P3	QGPPQ
P4	GPPQ
P5	PPQ
P6	PQ
P7	PQGPP
P8	PQGP
P9	PQG

最小結合部位を同定するために、表 2 に示した GRPQGPPQ の N 末端側と C 末端側からアミノ酸残基を 1 つずつ欠落させたデリーションペプチドを用

い, それらペプチドによる 125 I-Fim の PRP1 被覆 HA への結合阻害実験を行った. まず, N 末端側からのデリーションペプチドによる阻害実験の結果を図 8 に示した. Gly と Gly-Arg をそれぞれ欠落させたペプチド P1 と P2 では, 阻害効果は peptide138-145 とほとんど変わらず, 有意な差が認められた. しかし, Pro と Pro-Gln を欠落させたペプチド P3 と P4 では, 阻害効果が大きく減少した.

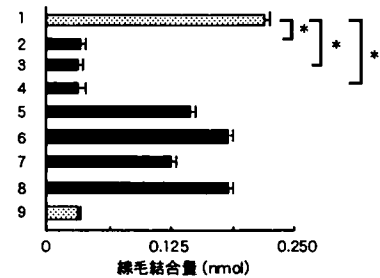


図8 デリーション合成ペプチドによる*P. gingivalis*線毛のPRP1被覆HAへの結合の阻害

1. インヒビターなし 2. peptide138-145 3. P1 4. P2
5. P3 6. P4 7. P5 8. P6 9.非標識線毛
(*: 各値は平均値±標準偏差を示し, $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

次に, ペプチド P2 の C 末端側からのデリーションペプチドによる結合阻害実験を行い, その結果を図 9 に示した. Gln を外したペプチド P7 では, 阻害効果が 35%弱まり, 有意な差が認められたが, 続いて Pro を外したペプチド P8 では, 阻害効果がほとんど消失し, 差は認められなかった.

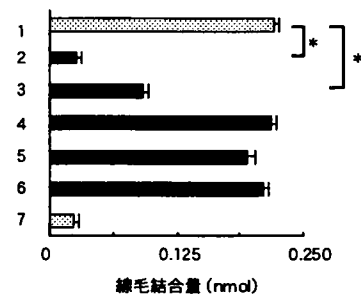


図9 デリーションペプチドによる*P. gingivalis*線毛のPRP1被覆HAへの結合の阻害

1. インヒビターなし 2. P2 3. P7 4. P8 5. P9 6. P6
7. 非標識線毛
(*: 各値は平均値±標準偏差を示し, $P < 0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

6.r-pPRP-C の分泌

図 10 に構築した pMNK-5 プラスミドベクターを示す. この pMNK-5 を挿入し, 形質転換した r-Sg

からの r-pPRP-C 分泌を確認するために、培養上清を濃縮した r-Sg 粗標品を調製した。

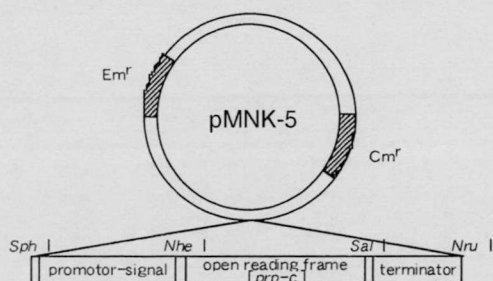


図10 構築したpMNK-5プラスミドベクター

そして、図 11- (A) に示すように r-Sg 粗標品溶液 20 μ l を PVDF 膜に転写させ、ウサギ抗 pPRP-C 抗体を用いたドットブロット法により検出したところ、r-Sg 粗標品溶液では明らかな反応が認められたのに対して、w-Sg 粗標品溶液では反応が認められなかった。また、図 11- (B) に示すように、r-pPRP-C の分子量をウエスタンブロッティング法により確認した。r-Sg 粗標品溶液では、合成 pPRP-C と同じ分子量の位置にバンドが認められ、このことから、宿主菌である *S. gordonii* から、リーダシーケンス部で消化された r-pPRP-C が分泌されていると考えられた。

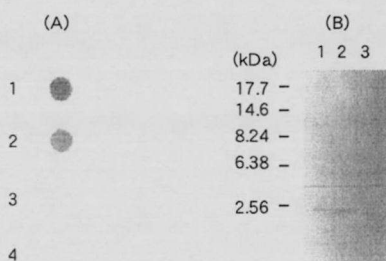


図11 r-pPRP-C分泌の確認

(A)ドットブロット法は、1 mg/mlのpPRP-C、40 mg/mlのr-Sg粗標品、w-Sg粗標品または1% BSA、20 μ lをPVDF膜に吸着させた。ウサギ抗 pPRP-C抗体によりr-pPRP-Cを検出した。
1. pPRP-C 2. r-Sg粗標品 3. w-Sg粗標品 4. BSA

(B)ウエスタンブロット法は、1 mg/mlのpPRP-C、40 mg/mlのr-Sg粗標品またはw-Sg粗標品、20 μ lを標品とし、ウサギ抗pPRP-C抗体によりr-pPRP-Cを検出した。左側のレーンは、分子量マーカーである。
1. r-Sg粗標品 2. pPRP-C 3. w-Sg粗標品

次に、r-Sg 培養上清 100 μ l 中の r-pPRP-C の量を ELISA 法（吸光度 450 nm）により定量した。既知量の合成 pPRP-C を w-Sg 培養上清に溶解し、求められた回帰直線 ($Y=8.8 \times 10^{-3}X+2.8 \times 10^{-3}$) より、分

泌 r-pPRP-C の濃度は、4.3 nmol/ml (8.6 μ g/ml) と算出された (図 12)。

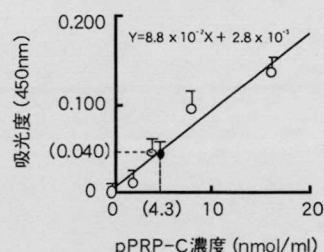


図12 ELISA法によるr-Sgから分泌されたr-pPRP-Cの定量

(○)は、100 μ lのw-Sg培養上清にpPRP-Cを溶解し、pPRP-C濃度が0, 2, 4, 8, 16 nmol/mlとなるように調整した。

(●)は、100 μ lのr-Sg培養上清
(各値は平均値±標準偏差を示す)

7. r-pPRP-C による線毛および菌体の結合阻害効果

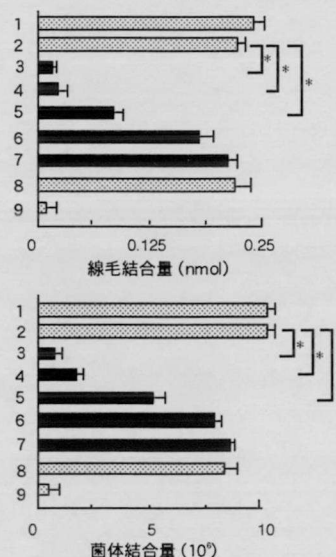


図13 w-Sg粗標品溶液中のpPRP-Cによる *P. gingivalis*線毛または菌体のPRP1被覆HAへの結合の阻害

供した阻害剤(200 μ l)として、w-Sg粗標品溶液1mlにpPRP-C 500 nmolを溶解したもの(pPRP-C量100 nmol)を段階希釈した。

1. 阻害剤なし 2. PRP1 3-7. pPRP-C(100, 50, 25, 13, 6 nmol)
8. w-Sg粗標品 9. 非標識線毛

(*: 各値は平均値±標準偏差を示し、 $P<0.01$ は対照群に比較して有意差があることを示す)

図 13 は、pPRP-C の PRP1 被覆 HA への 125 I-Fim または 3 H-cell の結合阻害の結果である。線毛、菌体の両者において、pPRP-C の濃度依存的に結合阻害が認められた。w-Sg 粗標品溶液に PRP1 (0.5 μ mol/ml) を溶解したものを対照としたところ、pPRP-C 100 nmol では、線毛 93%、菌体 90%の阻

害を示し、対照群と有意な差が認められた。図 14 は、r-Sg 粗標品による PRP1 被覆 HA への 125 I-Fim または 3 H-cell の結合阻害を検討した結果である。w-Sg 粗標品溶液を対照としたところ、供した r-Sg 粗標品 8 mg では、線毛 77%、菌体 72%の阻害を示し、対照群と有意な差が認められた。この r-Sg 粗標品 8 mg には、先得た r-Sg 培養上清中の r-pPRP-C 濃度から 40.4 nmol 相当の r-pPRP-C を含んでおり、r-pPRP-C は、pPRP-C と PRP1-*P. gingivalis* の結合において、同等の阻害効果を示すと考えられた。

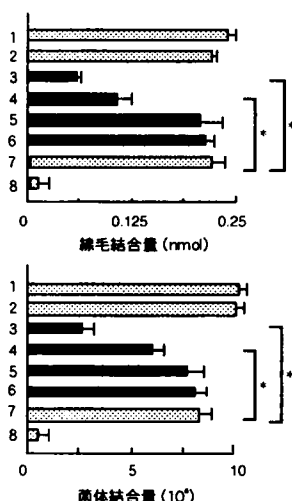


図14 r-Sg粗標品溶液による*P. gingivalis*線毛または菌体のPRP1被覆HAへの結合の阻害

供した阻害剤(200 μ l)として、r-Sg粗標品溶液を段階希釈した。
1. 阻害剤なし 2. PRP1 3-6. r-Sg粗標品(乾燥標品として8, 4, 2, 1 mg) 7. w-Sg粗標品 8. 非線毛
(* : 各値は平均値±標準偏差を示し、 $P < 0.01$ は対照群と比較して有意差があることを示す)

8.pPRP-C と r-pPRP-C による *P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共凝集阻害効果

P. gingivalis と口腔レンサ球菌との共凝集に及ぼす pPRP-C の影響を濁度分光分析法により検討した。図 15 に示すように、pPRP-C は、濃度依存的に共凝集を阻害した。pPRP-C 133 nmol/ml の濃度での *S. mitis* ATCC 15909 株との共凝集を 81%阻害した。また、*S. mitis* ATCC 15912 株では 73%、*S. gordonii* G9B 株では 70%、*S. oralis* ATCC 9811 株では 68%、*S. oralis* ATCC 10557 株では 60%、*S. downei* MFe28 株では 54%、そして、*S. sanguis* ATCC 10556 株では 44%の阻害が認められた。

表3 *P. gingivalis*と各種口腔レンサ球菌との共凝集に及ぼすr-pPRP-Cの影響

菌株	pPRP-C [*]	r-Sg ^{**} 粗標品	w-Sg ^{***} 粗標品
<i>S. gordonii</i> G9B	2+	1+	4+
<i>S. mitis</i> ATCC 15912	1+	1+	4+
ATCC 15909	1+	2+	3+
<i>S. oralis</i> ATCC 9811	1+	1+	4+
ATCC 10557	2+	2+	4+
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	1+	1+	4+
<i>S. downei</i> MFe28	1+	1+	4+

*陽性対照として、阻害剤は200 μ lのw-Sg粗標品溶液にpPRP-C40 nmol/mlを溶解したものであり、反応液中濃度は67 nmol/mlとなる。

**阻害剤は、200 μ lのr-Sg粗標品溶液であり、ELISA法の結果からr-pPRP-Cの反応液中濃度は67 nmol/mlとなる。

***陰性対照として、w-Sg粗標品溶液、200 μ lを用いた。

さらに、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共凝集に及ぼす r-Sg 粗標品の影響を検討し、結果を表 3 に示した。陽性対照として、w-Sg 粗標品溶液に pPRP-C を溶解したもの、そして、陰性対照として、w-Sg 粗標品溶液を用いた。判定法には、Cisar らの方法を用いた。r-Sg 粗標品は、供試した口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* とのそれぞれの共凝集を、pPRP-C と同程度に阻害した。

考 察

本研究では、いくつかの PRP1 ペプチドを用いて、*P. gingivalis* 線毛と結合する PRP1 の最小結合部位の検索を行った結果、PRP1 の C 末端側アミノ酸配列中の 140-145 アミノ酸残基である PQGPPQ が、*P. gingivalis* 線毛と結合する最小結合部位と推定された。

はじめに、PRP1 を N フラグメント、M フラグメントと pPRP-C フラグメントの 3 つのフラグメントに分割し、*P. gingivalis* 線毛との結合領域を調べた。その結果、*P. gingivalis* 線毛は、PRP1 の N フラグメントとは結合しなかった。PRP1 の N 末端側 1-30 アミノ酸残基は、酸性アミノ酸を多く含まれることから、HA 表面への強い親和性が報告されている^{21,36)}。従って、*P. gingivalis* 線毛と PRP1 との相互作用において、酸性アミノ酸の電荷的影響は少ないと考えられた。また、予備実験で、塩化ナトリウムや塩基性アミノ酸である L-アルギニンや L-ヒスチジンでは、*P. gingivalis* 線毛の PRP1 被覆 HA への結合を阻害しなかったことから、*P. gingivalis* 線毛と M フラグメントや pPRP-C フラグメントとの結

合は、陰・陽イオンを介した静電的な相互作用ではなく、特異的なレセプターリガンドによる結合様式をとる可能性が考えられた。

次に、PRP1 の C 末端側での結合部位について、合成ペプチドを用いて調べたところ、図 5 に示したように、peptide 75-89, peptide 90-106, peptide 107-120, pPRP-C が *P. gingivalis* 線毛と結合することから、この 4 つのペプチド中に *P. gingivalis* 線毛との付着に関与している部位が存在すると推測された。これら 4 つのペプチドには、アミノ酸配列中の 75-80 番目、92-97 番目、109-114 番目、140-145 番目に PQGPPQ といった共通したアミノ酸配列がみられる。しかし、図 6 で示したように、*P. gingivalis* 線毛の結合阻害実験では、pPRP-C のみが PRP1 被覆 HA への結合を阻害し、peptide 75-89, peptide 90-106, peptide 107-120 は阻害を示さなかった。このことは、peptide 75-89, peptide 90-106, peptide 107-120 中の PQGPPQ に後続するアミノ酸配列に QGGH が共通に存在しており、この QGGH アミノ酸残基が溶液中では結合領域を隠蔽しているのかもしれない。つまり、溶液中では peptide 75-89, peptide 90-106, peptide 107-120 の各ペプチド内部では、QGGH 残基がレセプターと推測される PQGPPQ を立体構造的に隠蔽し、線毛と結合できない状態を起こすことが考えられるが、pPRP-C には QGGH 残基が存在しないために、溶液中においても PQGPPQ が露出し、pPRP-C が PRP1 と線毛との結合を阻害するものと推測された。

さらに、pPRP-C を構成するペプチドの中では、peptide 138-145 が強い結合阻害を示したが、peptide 130-137 と peptide 146-150 にも弱いながらの結合の阻害がみられた。これらペプチドは PQGPPQ のアミノ酸配列をもたないが、この配列と相同性の高いアミノ酸配列を有し、PQGPPQ とは異なる線毛結合部位存在の可能性も考えられる。しかし、peptide 138-145 は pPRP-C と同程度の強い阻害を示したことから、GRPQGGPPQ が主要な結合部位と推定された。

最小結合部位を決定するために、GRPQGGPPQ を N 末端または C 末端側より順次アミノ酸を欠落させた合成ペプチド（表 2）を用いて結合部位を調べたところ、PQGPPQ には強い阻害活性が認められたが、

PQGPPQ 中の両端に存在する PQ をそれぞれ欠落させた時、阻害活性が極端に弱くなった。このことより、ペプチド P2 相当の PQGPPQ が *P. gingivalis* 線毛との最小結合部位であり、N 末端側と C 末端側の両端に存在する Pro-Gln のジペプチドは、結合の際の重要な役割を果たしていると考えられた。

また、この PQGPPQ と相同性の高いアミノ酸配列をもつヒトタンパク質をデータベース（BLASTP-Swissprot/UPD:European Bioinformatics Institute, University of Genova）を用いて検索したところ、ヒト唾液では、PRP1 を含む PRPs だけでなく、塩基性 PRPs や PRGP にも PQGPPQ, PQGPP, PQGPPQ といった配列が認められた。Naito らは、線毛をもつ *P. gingivalis* がヒトコラーゲンタイプ I や IV と結合することを報告している³⁷⁾が、ヒトコラーゲンタイプ I や IV においても PQGPP の反復配列を保有していることが明らかにされている。*P. gingivalis* の口腔内への定着の際の初期付着における結合は、PRP1 のみでなく他の PRPs, PRGP やコラーゲンタイプ I・IV 中の、PQGPPQ と相同性の高い部位が共通して関与している可能性が高いと考えられるが、最近、Amano らは、pPRP-C が *P. gingivalis* 線毛と PRGP, 塩基性 PRP との結合を抑制したことを報告している³⁸⁾。

口腔常在菌である *S. gordonii* の形質転換株に *P. gingivalis* 線毛との結合領域を含む pPRP-C を分泌させ、その r-pPRP-C が *P. gingivalis* 線毛を介する付着に及ぼす影響を調べた。r-Sg により r-pPRP-C が 4.3 nmol/ml の濃度で培養上清中に分泌していることを確認後、この培養上清を阻害剤として PRP1 被覆 HA への *P. gingivalis* 線毛の結合阻害実験に供試したところ、阻害効果はみられなかった。培養上清中の r-pPRP-C 量が不十分であることが考えられたため、培養上清を濃縮した r-Sg 粗標品を使用した。図 13 や 14 に示すように、同様に調製した w-Sg 粗標品溶液においてもごくわずかな阻害効果が認められたが、r-pPRP-C は、合成 pPRP-C と同等の高い阻害効果を示した。また、pPRP-C は、*P. gingivalis* と数種の口腔レンサ球菌との共凝集に対しても顕著な阻害を示し、r-pPRP-C もまた同程度の高い阻害効果を示した。*P. gingivalis* の口腔内における初期定着の場として、*S. gordonii* をはじめとするブラク細

菌の菌体表面が考えられることから、本研究で形質転換した *S. gordonii* が分泌した r-pPRP-C は、*P. gingivalis* の他の菌体への付着の抑制にも作用する可能性が考えられる。しかし、本研究では、r-pPRP-C が *P. gingivalis* 線毛または *S. gordonii* 菌体のどちらに結合し、共凝集を抑制するのかは明らかにされていない。Nakai らは、*S. mutans* の表面抗原タンパク質である PAc が各唾液タンパク質の高プロリン領域に結合すると報告しており³⁹⁾、同様に他の口腔レンサ球菌の表面にも、pPRP-C 中の高プロリン領域と結合するタンパク質が存在し、*P. gingivalis* と結合する口腔レンサ球菌の結合部位を pPRP-C がブロックすることにより共凝集を抑制している可能性も否定できない。

これまでに、外来遺伝子を挿入したプラスミドをヒト口腔常在菌に組み込むことにより生理活性のある物質を発現・分泌させるシステムがいくつか報告されている。例えば、*S. mutans* が産生するグルカンを加水分解するデキストラナーゼを *S. gordonii* に分泌させるために、*S. gordonii* と大腸菌のシャトルベクター pVA838 にデキストラナーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを構築したという報告がある²³⁾。しかし、この方法では、抗生物質が存在しないと形質転換株中の外来遺伝子が消失する。その問題点を解決するために、Shiroza らは、resident plasmid integration 法を考案し²⁵⁾、*S. mutans* のグルコシルトランスフェラーゼの働きを阻害する *Bacillus circulans* 遺伝子を *S. mutans* 遺伝子に組み込み、*Bacillus circulans* 遺伝子上にあるサイクロイソマルトオリゴサッカライド グルカノトランスフェラーゼを発現・分泌させることに成功した²⁶⁾。また、*P. gingivalis* 線毛のサブユニットであるフィンブリリン遺伝子を *S. gordonii* の遺伝子に組み込むことによりフィンブリリンを分泌させたという報告がある²⁴⁾が、この分泌されたりコンビナントフィンブリリンの in vitro および in vivo での作用については明らかにされていない。

上記の報告を含め遺伝子操作された口腔常在菌によって発現されたりコンビナントペプチドの分泌量についての報告はこれまで皆無である。医学的・商業的に進められている *Bacillus* 属に発現・分泌させた生理活性物質では、 α -アミラーゼは 1.5 mg/ml⁴⁰⁾

で、インターフェロンは 0.5-1.0 μ g/ml⁴¹⁾の濃度で分泌されている。本研究では、pPRP-C を *S. gordonii* に分泌させた r-pPRP-C の分泌量は 8.6 μ g/ml であり、この発現・分泌量は、上記の報告の範囲内であった。

P. gingivalis は、重度な成人性歯周炎患者から多く検出され、有力な歯周病発症の原因菌と考えられており⁴²⁾、歯周病を予防するためには、この原因菌の口腔内への定着を妨げることが予防戦略のひとつとなるであろう。pPRP-C は *P. gingivalis* の唾液タンパク質で被覆された表面への付着を抑制するだけでなく、口腔レンサ球菌との共凝集をも抑制することから、pPRP-C の臨床応用することにより、*P. gingivalis* の定着を選択的に阻害し、化学的プラークコントロールの一手段となりうることが期待される。しかし、in vivo において、pPRP-C が *P. gingivalis* の定着を抑制するかどうかは不明であり、今後、pPRP-C を *P. gingivalis* の感染や歯周病の発症を「予防」する機能をもつ物質として応用するにはさらなる研究が必要となろう。

結 論

1. *P. gingivalis* 線毛とヒト唾液から精製した各 PRP1 フラグメントとの結合を調べたところ、PRP1 の C 末端部分のフラグメントが強い結合を示し、なかでも pPRP-C フラグメントが最も強固な結合を示した。
2. PRP1 被覆 HA への菌体または線毛の結合に対しても、pPRP-C フラグメントが最も強い阻害を示した。
3. PRP1 の C 末端部分を構成する 5 種のペプチドとして、peptide75-89, peptide90-106, peptide107-120, peptide121-129 および pPRP-C を合成し用いた線毛との結合実験では、peptide121-129 を除く 4 種のペプチドにおいて強い結合を認めた。また、これらの 5 種の合成ペプチドのうち、pPRP-C のみが線毛の PRP1 被覆 HA への結合阻害を示した。
4. pPRP-C をさらに分割したペプチドによる結合阻害実験から peptide138-145 (GRPQGPPQ) が pPRP-C と同等の結合阻害効果が認められた。その GRPQGPPQ アミノ酸配列を基にデリションペプ

チドを合成し、それらペプチドを用いた線毛の PRP1 被覆 HA への結合阻害能から PRP1 との最小結合部位を推定したところ、Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-Gln であることが示された。

5. *S. gordonii* 形質転換株の培養上清中には r-pPRP-C の明らかな分泌が認められ、その濃度は 4.3 nmol/ml と推定された。r-Sg 粗標品による PRP1 被覆 HA に対する菌体および線毛の結合阻害では、濃度依存的に抑制が認められ、最終濃度において、それぞれ 72 % と 77 % の抑制が認められた。

6. r-Sg 粗標品は、*P. gingivalis* と *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis* および *S. downei* とのそれぞれの共凝集を著明に抑制した。

以上の結果より、*P. gingivalis* 線毛の PRP1 分子内での最小結合領域は Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-Gln であり、*S. gordonii* 形質転換株が分泌した r-pPRP-C は、*P. gingivalis* 線毛による PRP1 被覆 HA への結合を阻害するだけでなく、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共凝集も阻害することが示され、これらの実験系が、*P. gingivalis* の口腔内への定着抑制モデルとして有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部予防歯科学講座 零石聡教授ならびに本学部附属病院障害者歯科治療部 天野敦雄講師に深甚なる謝意を表します。また、組み換え DNA 実験における、御教示と御助言を賜りました口腔細菌学講座 川端重忠助教授に厚くお礼申し上げます。最後に本研究に御協力いただきました予防歯科学講座および口腔細菌学講座の諸先生方に深く感謝いたします。

- 1) Dahlen, G. G.(1993): Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 6, 181-192.
- 2) Zambon, J. J.(1990): Microbiology of periodontal disease. p. 147-160. In R. J. Genco, H. M. Goldman, and D. W. Cohen (ed), Contemporary periodontics. The C. V. Mosby Co., St. Louis.
- 3) van Steenberg, T. J. M., A. J. van Winkelhoff and J. de Graaf.(1991): Black-pigmented oral anaerobic rods; classification and role in periodontal disease, p. 41-52. In S. Hamada, S. C. Holt, and J. R. McGhee (ed), Periodontal disease: pathogens and host immune responses. Quintessence Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- 4) Danser, M. M., M. F. Timmerman, A. J. van Winkelhoff and U. van der Velden.(1996): The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J. Periodontol.* 67, 478-485.
- 5) Conrads, G., R. Mitters, J. Fischer, A. Brauner, R. Lutticken and F. Lampert.(1996): PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J. Periodontol.* 67, 994-1003.
- 6) Zambon, J. J., H. S. Reynolds, R. G. Dunford, W. DeVizio, A. R. Volpe, R. Berta, J. P. Tempore and Y. Bonta.(1995) Microbial alterations in supragingival dental plaque in response to a triclosan-containing dentifrice. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 247-255.
- 7) Okuda, K. (1993) Attachment mechanisms and colonization, p. 139-158: In H. N. Shah, D. Mayrand, and R. J. Genco (ed), Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- 8) Lee, J.-Y., H. T. Sojar, G. S. Bedi and R. J. Genco. (1992.) Synthetic peptides analogous to the fimbrillin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 60, 1662-1670.
- 9) Amano, A., T. Fujiwara, H. Nagata, M. Kuboniwa, A. Sharma, H. T. Sojar, R. J. Genco, S. Hamada and S. Shizukuishi.(1997) *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. *J. Dent. Res.* 76, 852-857
- 10) Malek, R., J. G. Fisher, A. Caleca, M. Stinson, C. J. VanOss, J.-Y. Lee, M.-I. Cho, R. J. Genco, R. T. Evans and D. W. Dyer. 1994. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J. Bacteriol.* 176, 1052-1059.
- 11) Amano, A., H. T. Sojar, J.-Y. Lee, A. Sharma, M. J.

- Levine and R. J. Genco.(1994)Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 62, 3372-3380.
- 12) Hay, D. I., J. M. Ahem, S. K. Schluckebier and D. H. Schlesinger.(1994)Human salivary acidic proline-rich protein polymorphisms and biosynthesis studied by high-performance liquid chromatography. *J. Dent. Res.* 73, 1717-1726.
- 13) Amano, A., S. Shizukuishi., H. Horie, S. Kimura, I. Morisaki and S. Hamada. (1998) Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect. Immun.* 66, 2072-2077.
- 14) Amano, A., K. Kataoka, P. A. Raj, R. J. Genco and S. Shizukuishi.(1996) Binding sites of salivary statherin to *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin. *Infect. Immun.* 64, 4249-4254.
- 15) Amano, A., A. Sharma, J.-Y. Lee, H. T. Sojar, P. A. Raj and R. J. Genco.(1996)Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. *Infect. Immun.* 64, 1631-1637.
- 16) Hamada, S., A. Amano, S. Kimura, I. Nakagawa, S. Kawabata, I. Morisaki.(1998)The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Micro. Immun.* 13, 129-138.
- 17) Kolenbrander, P. E., N. Ganeshkumar, F. J. Cassels and C.V. Hughes. (1993) Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* Mar. 7(5), 406-413.Review. PMID: 8462782; UI: 93215982.
- 18) Lamont, R. J. and H. F. Jenkinson.(1998) Life below the gum line; Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Mol. Biol. Rev* 62, 1244-1263.
- 19) Gibbons, R. J., D. I. Hay, W. C. I. Ghilds and G. Davis.(1990) Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Archs. Oral Biol.* 35, 107-114.
- 20) Gibbons, R. J. and D. I. Hay.(1988) Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. p. 143-169. In L. M. Switalski, M. Hook, and E. Beachey (ed), *Molecular mechanisms of microbial adhesion*. Springer-Verlag, New York.
- 21) Hay, D. I. and E. C. Moreno. (1989) Statherin and acidic proline-rich proteins, p.131-150: In J. O. Tenovuo (ed.), *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology*, Vol. 1. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- 22) Gibbons, R. J.(1989)Bacterial adhesion to oral tissues; A model for infectious diseases. *J. Dent. Res.* 68, 750-760.
- 23) Kubo, S., H. Kubota, Y. Ohnishi, T. Morita, T. Matsuya and A. Matsusiro.(1993) Expression and secretion of an *Arthrobacter* Dextranase in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun.* 61, 4375-4381
- 24) Sharma, A., H. Nagata, N. Hamada, H. T. Sojar, D. E. Hruby, H. K. Kuramitsu and R. J. Genco.(1996) Expression of functional *Porphyromonas gingivalis* fimbriin polypeptide domains on the surface of *Streptococcus gordonii* . *Appl. Env. Micro.* 62, 3933-3938.
- 25) Shiroza, T. and H. K. Kuramitsu.(1995) Development of a heterodimer plasmid system for the introduction of heterologous genes into streptococci. *Plasmid.* 34, 85-95
- 26) Shiroza, T., N. Shinozaki, M. Hayakawa, T. Fujii, T. Oguma, M. Kobayashi, K. Fukushima and Y. Abiko.(1998) Application of the resident plasmid integration technique to construct a strain of *Streptococcus gordonii* able to express the *Bacillus circulans* cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase gene, and secrete its active gene product. *Gene.* 207, 119-126
- 27) Nagata, H., Y. Murakami, E. Inoshita, S. Shizukuishi and A. Tsunemitsu.(1990) Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation between *Bacteroides gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *J. Dent. Res.* 69(8), 1476-1479
- 28) Yoshimura, F., K. Takahashi, Y. Nodasaka and T. Suzuki.(1984)Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* 160, 949-957.
- 29) Ramasubbu, N., M. S. Reddy, E. J. Bergey, G. G. Haraszthy, S.-D. Soni and M. J. Levine.(1991) Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem. J.* 280, 341-352.
- 30) Amano, A., S. Shizukuishi, A. Tsunemitsu, K. Maekawa and S. Tunasawa.(1990) The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. *FEBS Lett.* 272, 217-220.
- 31) Sojar, H. T., J.-Y. Lee, G. S. Bedi, M.-I. Cho and R. J. Genco.(1991) Purification, characterization and immunolocalization of fimbrial protein from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 713-719.
- 32) Green, N., H. Alexander, A. Olson, S. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe and R. A. Lerner.(1982) Immunogenic structure of the influenza virus

- hemagglutinin. *Cell*. 28, 477-487
- 33) Macrina, F. L., J. A. Tobian, K. R. Jones, R. P. Evans and D. B. Clewell.(1982) A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*. 19, 345-353.
 - 34) Laemmli, U. K.(1970)Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685
 - 35) Cisar, J. O., P. E. Kolenbrander and P. E., McIntire, F. C.(1979) Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomysces naeslundii*. *Infect. Immun.* 24, 742-752.
 - 36) Johnsson, M., M. J. Levine, and G. H. Nancollas.(1993) Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 371-378.
 - 37) Naito, Y. and R. J. Gibbons.(1988) Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J. Dent. Res.* 67, 1075-1080.
 - 38) Amano, A., T. Nakamura, S. Kimura, I. Morisaki, I. Nakagawa, S. Kawabata and S. Hamada (1998) Molecular interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with host proteins: Kinetic analyses based on surface plasmon resonance. *Infect. Immun.* 67, 2399-2405
 - 39) Nakai, M., N. Okahashi, H. Ohta and T. Koga. (1993) Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infect. Immun.* 61, 4344-4349
 - 40) Palva, I.(1982) Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene*. 19, 81-87
 - 41) Palva, I., P. Lehtovaara, L. Kaariainen, M. Sibakov, K. Cantell, C. H. Schein, K. Kashiwagi and C. Weissmann.(1983) Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene*. 22, 229-235
 - 42) Darveau, R. P., A. Tanner and R. C. Page.(1997)The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* 2000 14, 12-32.